

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-508043

(43) 公表日 平成11年(1999) 7月13日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
G 0 1 N 27/327		G 0 1 N 27/30	3 5 1
27/12		27/12	Z
27/333		33/543	5 9 3
27/416		27/30	3 3 1 C
33/543	5 9 3	27/46	3 8 6 Z
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 32 頁)
(21) 出願番号	特願平9-503455	(71) 出願人	オーストラリアン メンブレイン アンド バイオテクノロジー リサーチ インス ティテュート オーストラリア国 2067 ニューサウスウ ェールズ チャッツウッド グレヴィル ストリート 126
(86) (22) 出願日	平成8年(1996) 6月20日	(71) 出願人	ザ ユニバーシティ オブ シドニー オーストラリア国 2006 ニューサウスウ ェールズ シドニー パラマッタ ロード (番地なし)
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997) 12月19日	(74) 代理人	弁理士 志賀 正武 (外1名)
(86) 国際出願番号	P C T / A U 9 6 / 0 0 3 6 8		
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 0 1 0 9 1		
(87) 国際公開日	平成9年(1997) 1月9日		
(31) 優先権主張番号	P N 3 6 6 8		
(32) 優先日	1995年6月20日		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), AU, JP, US		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 小アナライトの検出

(57) 【要約】

アナライト、特に5000ダルトン未満の分子量のような小アナライトを検出するのに使用するバイオセンサーが開示され、これは一つの膜と電極とそれらの間にある容器から成り、この膜は電極に隣接する内層と電極から離れた外層をもち、両親媒性の分子、多数のイオノホアおよび多数の膜貫通脂質の密に充填された配列から成り、イオノホアは第一と第二の半膜貫通モノマーから成り、第一の半膜貫通モノマーは内膜内にあり、膜内の横の拡散から守られており、第二の半膜貫通モノマーは小アナライトと反応性のある第一のレセプターと接触しており、多数のアナライトと接触しているキャリアーがアナライトを介して第一のレセプターと可逆的に結合している。別の実施態様では、第二の半膜貫通モノマーは少なくとも1つのアナライトとキャリアーおよび/またはリンカー群を介して接触しており、レセプターはアナライトおよびそのキャリアーおよび/またはリンカー群を介して第二の半膜貫通モノマーと可逆的に結合している。

【特許請求の範囲】

1. 1つの膜と1つの電極とその間に形成される1つの貯蔵器から成るバイオセンサーであって、電極に近い内層および電極から離れた外層から成る膜は両親媒性の分子がきっちり詰まった配列および複数のイオン透過体および複数の膜貫通脂質類から成り；該イオン透過体は第一と第二の半膜貫通単量体類から成り、「第一の半膜貫通単量体類」は内層に提供されて膜の内部で横方向への拡散が妨げられ、「第二の半膜貫通単量体類」は外層に提供され膜の内部で横方向に拡散するのが自由であり、「第二の半膜貫通単量体」には分析物と反応する第一受容体が結びついており、複数の分析物が結びついている担体は分析物により第一受容体に可逆的に結合されることを特徴とする、分析物を検出するために使用するバイオセンサー。
2. 第一受容体がリンカー基類により「第二の半膜貫通単量体類」に結びついていることを特徴とする請求項1のバイオセンサー。
3. 担体は、第一受容体が結びついている「第二の半膜貫通単量体類」の間に橋を形成するように2個以上の第一受容体に可逆的に結合されることを特徴とする請求項1または請求項2のバイオセンサー。
4. 分析物と反応する第二受容体も膜貫通脂質類の上に提供され、脂質類が膜の内部で横方向に拡散するのを妨げることを特徴とする請求項1または請求項2のバイオセンサー。
5. 第二の受容体類がリンカー基類により膜貫通脂質類に結びつくことを特徴とする請求項4のバイオセンサー。
6. 担体は、第一受容体および第二受容体が結びついている膜の構成部材の間に橋を形成するように少なくとも1個の第一受容体および第二受容体に可逆的に結合されることを特徴とする請求項4または請求項5のバイオセンサー。
7. 担体が分析物より実質的に大きいことを特徴とする請求項1から請求項6のいずれか1項のバイオセンサー。
8. 担体が蛋白質、多糖類または重合体であることを特徴とする請求項1から請求項7のいずれか1項のバイオセンサー。

9. 担体がウシ血清アルブミン、ポリリシン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、またはポリアクリル酸から選ばれることを特徴とする請求項8のバイオセンサー。

10. 担体が分析物の分子量の2-50倍の分子量を有することを特徴とする請求項8または請求項9のバイオセンサー。

11. 担体が10,000-100,000ダルトンの範囲の分子量を有することを特徴とする請求項8から請求項10のいずれか1項のバイオセンサー。

12. 1つの膜と1つの電極とその間に形成される1つの貯蔵器から成るバイオセンサーであって、電極に近い内層および電極から離れた外層から成る膜は両親媒性の分子がきっちり詰まった配列および複数のイオン透過体および複数の膜貫通単量体類から成り；該イオン透過体は第一と第二の半膜貫通単量体類から成り、「第一の半膜貫通単量体類」は内層に提供されて膜の内部で横方向への拡散が妨げられ、「第二の半膜貫通単量体類」は外層に提供され膜の内部で横方向に拡散するのが自由であり、「第二の半膜貫通単量体」は担体およびまたはリンカー基により結びついた少なくとも1個の分析物を有しており、該分析物と反応する受容体は該分析物および前記担体および／またはリンカー基により「第二の半膜貫通単量体類」に可逆的に結合されることを特徴とする、分析物を検出するために使用するバイオセンサー。

13. 受容体は2個以上の「第二の半膜貫通単量体類」の間に橋を形成するように2個以上の分析物結合部位を有することを特徴とする請求項12のバイオセンサー。

14. 受容体上にある分析物結合部位が「第一の半膜貫通単量体類」の間の距離の80%未満だけ離されることを特徴とする請求項13のバイオセンサー。

15. 「第二の半膜貫通単量体類」は担体および／またはリンカー基類により複数の分析物に結びついていることを特徴とする請求項12から請求項14のいずれか1項のバイオセンサー。

16. 分析物（類）は、リンカー基類により「第二の半膜貫通単量体類」に結びついていることを特徴とする請求項12から請求項15のいずれか1項のバイオ

センサー。

17. 複数の分析物が、「第二の半膜貫通単量体類」に結びついている担体上に存在することを特徴とする請求項15のバイオセンサー。

18. 担体類が、リンカー基類により、「第二の半膜貫通単量体類」に結びついていることを特徴とする請求項17のバイオセンサー。

19. 担体が蛋白質、多糖類または重合体であることを特徴とする請求項1から請求項18のいずれか1項のバイオセンサー。

20. 担体がウシ血清アルブミン、ポリリシン、デキストラン、カルボキシメチルデキストランまたはポリアクリル酸から選ばれることを特徴とする請求項19項のバイオセンサー。

21. 担体が分析物の分子量の2-50倍の分子量を有することを特徴とする請求項19または請求項20のバイオセンサー。

22. 担体が10,000-100,000ダルトンの範囲の分子量を有することを特徴とする請求項19から請求項21のいずれか1項のバイオセンサー。

23. 1つの膜と1つの電極とその間に形成される1つの貯蔵器から成るバイオセンサーであって、電極に近い内層および電極から離れた外層から成る膜は両親媒性の分子がきっちり詰まった配列および複数のイオン透過体および第一と第二の半膜貫通単量体類から成る複数の膜貫通脂質類から成り；「第一の半膜貫通単量体類」は内層に提供されて膜の内部で横方向への拡散が妨げられ、「第二の半膜貫通単量体類」は外層に提供され膜の内部で横方向に拡散するのが自由であり、「第二の半膜貫通単量体類」はリンカー基により分析物に結びつけられており、2個以上の分析物結合部位を有する受容体は分析物により「第二の半膜貫通単量体類」に可逆的に結合されており、膜貫通脂質類は膜の中で横方向への拡散が妨げられ、またリンカー基により分析物に結びついたことを特徴とする、分析物を検出するために使用するバイオセンサー。

24. 受容体が抗体であることを特徴とする請求項1から請求項23のいずれか1項のバイオセンサー。

25. リンカー結合基類がストレプトアビジン、ニュートラビジンまたはアビジン

から成ることを特徴とする請求項2、3、5から16および18から24のいずれか1項のバイオセンサー。

26. 「第二の半膜貫通単量体類」がグラミシジンAまたはアンフォテリシンBの単量体類であることを特徴とする請求項1から請求項25のいずれか1項のバイオセンサー。

27. 「第一の半膜貫通単量体類」がグラミシジンEであることを特徴とする請求項1から請求項26のいずれか1項のバイオセンサー。

28. 分析物が小さな分析物であることを特徴とする請求項1から請求項27のいずれか1項のバイオセンサー。

29. 小さな分析物が5,000ダルトン未満の分子量を有する分析物であることを特徴とする請求項28のバイオセンサー。

30. 分析物がジゴキシゲニンであることを特徴とする請求項1から請求項29のいずれか1項のバイオセンサー。

【発明の詳細な説明】**小アナライトの検出**

本発明は一般に試料中の小アナライトまたはハプテンの濃度に応答して膜系のバイオセンサーを含むイオノホアの電気伝導度を変更する機構に関する。

生体膜は、密に充填された両親媒性の脂質分子の二重層から構成されている。これらの二重層の分子は液相の無作為運動特性を示し、この場合、脂質分子の炭化水素の端部は十分な可動性をもって柔らかい可撓性の粘着性の表面を与える。分子は自身の単分子層の中で自由に二次元に拡散することができるので、同じ単分子層の中の二つの隣合った脂質は、別の単分子層の脂質分子が位置を交換する場合よりずっと桁数の低い時間間隔で相互に位置を交換する。

これらの膜はイオノホアと呼ばれる一種の分子を含むことができ、これはこれらの膜を通ってのイオンの移動を助ける。イオンチャンネルはイオノホアの特定の形態であり、その語が意味するように、それを通して膜をイオンが通過するチャンネルである。好ましいイオノホアはグラミシジンAであり、これは膜内に水性のチャンネルを作る。オーストラリア特許明細書第40123/85号はバイオセンサーにイオノホアを含む膜の使用を開示している。ゲート付きのイオノホアの別の例がオーストラリア特許明細書第21279/88号に記載されており、これはレセプター側から離れた支持体と共役したレセプター分子を開示している。支持体は脂質の頭部群、炭化水素鎖、架橋可能な分子または膜ポリペプチドでもよい。膜の内面は固体面と反応性のある群で固体面と隣合ってもよく、国際特許明細書第92/17788号（その開示事項はここに文献として添付）に開示されているように、表面から離れて容器部分を提供してもよい。

金属電極に繋ぎ止められるかその上に載せられた脂質膜内に含まれるイオンチャンネルまたはイオノホアに基づくバイオセンサーはオーストラリア特許明細書第50334/90号および第40787/89号に開示されている。これらの文献は膜二重層を開示しており、この場合各層はイオノホアを含んでおり膜の伝導度はアナライトの存在または不在に左右される。オーストラリア特許明細書第

50334/94号（ここに文献として添付）の開示事項は、アナライトの存在

に応答して膜の伝導度を変えるイオノホアの種々のゲーティング機構を記載している。これらのゲーティング機構の各々においては、膜の内層（あるとすれば、固体の電極面に近い層）は固定されたかまたは繋ぎ止められた半膜貫通イオンチャンネルを含み、一方外層はもっと動き易い半膜貫通イオンチャンネルを含む。イオンチャンネルまたは内層を固定する一つの方法は、重合可能な脂質層を使ってつぎに内部の二重層の分子とイオノホアを架橋することである。膜の伝導度は膜を通るイオン移動のための膜貫通チャンネルを確立するために別の半膜貫通イオンチャンネルが整列する程度によって変わる。

膜に含まれるイオンチャンネルまたはイオノホアに基づく他のバイオセンサーは、国際特許明細書第WO 92/17788号、第WO 93/21528号、第WO 94/07593号および米国特許明細書第5204239号（その開示事項はここに文献として添付）に記載されている。これらの出願はまた、電極面に接触する両親媒性の分子の化学吸着層を使って、表面増幅効果、安定性およびイオン束を使う感度の優れた膜を作る方法、およびその化学吸着した両親媒性の分子上にイオノホアを含む脂質膜を作る手段を開示している。

本発明者らは、小アナライトの検出に使用される改良されたバイオセンサーを今や開発した。この改良されたバイオセンサーはしかし大型のアナライトにも使用できる。

第一の観点によれば、本発明は小アナライトの検出に使用されるバイオセンサーから成り、このバイオセンサーは一つの膜と電極とそれらの間にある容器から成り、この膜は電極に隣接する内層と電極から離れた外層をもち、両親媒性の分子、多数のイオノホアおよび多数の膜貫通脂質の密に充填された配列から成り、イオノホアは第一と第二の半膜貫通モノマーから成り、第一の半膜貫通モノマーは内膜内にあり膜内の横の拡散から守られており、第二の半膜貫通モノマーは外層内にあり膜内で自由に横に拡散し、第二の半膜伸長モノマーは小アナライトと反応性のある第一のレセプターと接触しており、多数のアナライトと接触しているキャリアーがアナライトを介して第一のレセプターと可逆的に結合している。

本発明の第一の観点の一つの好ましい実施態様においては、アナライトとも反

応性のある第二のレセプターが膜内の横の拡散から守られている膜貫通脂質上に与えられている。

第一および第二のレセプターは同じでも異なってもよい。

キャリアーは好ましくは二つ以上の第一のレセプターまたは二つ以上の第一および第二のレセプターと可逆的に結合して、レセプターの接触する膜のメンバーの間に「橋」を形成する。この方法で、第二の半膜伸長モノマーの一部は第一の半膜貫通モノマーによる登録外の位置に位置するようにされ、膜の伝導度が減少する。

好ましくは、キャリアーはアナライトより実質上大きく、例えばアナライトの分子量の2ないし50倍である。

第二の観点において、本発明はアナライトの検出に使用されるバイオセンサーから成り、このバイオセンサーは一つの膜と電極とそれらの間にある容器から成り、この膜は電極に隣接する内層と電極から離れた外層をもち、両親媒性の分子、多数のイオノホアおよび多数の膜貫通脂質の密に充填された配列から成り、イオノホアは第一と第二の半膜貫通モノマーから成り、第一の半膜貫通モノマーは内膜内にあり膜内の横の拡散から守られており、第二の半膜貫通モノマーは外層内にあり膜内で自由に横に拡散し、第二の半膜貫通モノマーは少なくとも一つのアナライトとキャリアーおよび／またはリンカー群を介して接触しており、アナライトと反応性のあるレセプターはアナライトおよびそのキャリアーおよび／またはリンカー群を介して第二の半膜貫通モノマーと可逆的に結合している。

好ましい実施態様においては、レセプターは二つ以上のアナライト結合部位をもち、二つ以上の第二の半膜貫通モノマーの間の橋の形成を可能にする。この方法で、第二の半膜貫通モノマーの一部は第一の半膜貫通モノマーとの登録から外れて凝集し、膜の伝導度が減少する。

好ましくは、レセプター上のアナライト結合部位は第一の半膜貫通モノマーの間の距離の80%未満で分離されている。また、好ましくは、第二の半膜貫通モノマーはキャリアーおよび／またはリンカー群を介して多数のアナライトと接触している。

本発明の別の好ましい実施態様においては、第一のレセプターまたは、第二の

観点によるバイオセンサーの場合には、アナライトまたはキャリアーはリンカー群を介して第二の半膜貫通モノマーに接触している。同様に、好ましくは第二のレセプターはリンカー群を介して膜貫通脂質に接触する。適切なリンカー群の例はストレプトビジン、ニュートラビジンおよびアビジンであり、これらはレセプターおよび膜のメンバー上に与えられるビオチン群に結合するのに使用される。

第三の観点において、本発明はアナライトの検出に使用されるバイオセンサーから成り、このバイオセンサーは一つの膜と電極とそれらの間にある容器から成り、この膜は電極に隣接する内層と電極から離れた外層をもち、両親媒性の分子、多数のイオノホアおよび多数の膜貫通脂質の密に充填された配列から成り、イオノホアは第一と第二の半膜貫通モノマーから成り、第一の半膜貫通モノマーは内膜内にあり膜内の横の拡散から守られており、第二の半膜貫通モノマーは外層内にあり膜内で自由に横に拡散し、第二の半膜貫通モノマーはリンカー群を介してアナライトに接触し、二つ以上のアナライト結合部位をもつレセプターはアナライトを介して第二の半膜貫通モノマーに可逆的に結合しており、膜貫通脂質は膜内で横の拡散から守られており、やはりリンカー群を介してアナライトに接触している。

すなわち、第三の観点によるバイオセンサーでは、レセプターは第二の半膜貫通モノマーに接触するアナライトならびに膜貫通脂質に接触するアナライトに結合することができる。この方法で、第二の半膜貫通モノマーの一部は、第一の半膜貫通モノマーとの登録から外れた位置に位置するようになる。

本発明のこれらの観点の性質がもっと容易に理解されるために、その好ましい形を図1b～1f、図2および図3に示す。

添付図面の簡単な説明

図1は、バイオセンサーのための種々のアナライトのゲーティング機構を図式的に示す：(a) 直接ゲーティング機構、(b) 外部チャンネル凝集、(c) 遊離の抗体を使う外部／内部チャンネル横方向隔離、(d) イオンチャンネル上に繋ぎ止められた抗体または繋ぎ止められた膜貫通脂質を使う外部／内部チャンネル横方向隔離、(e) イオンチャンネル上に繋ぎ止められた抗体および膜貫通脂

質を使う外部／内部チャンネル横方向隔離、および（f）は（e）に示す機構の好ましい実施態様を示す。

図2（a）～（d）は、膜種へのハプテンの接触の別の方法を示す。

図3は、重合によるゲーティングの方法を示す。

図4は、バイオセンサー膜の内層を構成するのに使用されるリンカー脂質Aの化学構造を示す。

図5は、本発明のバイオセンサーに固定内層イオンチャンネルとして使用されるリンカーグラミシジンBの化学構造を示す。

図6は、膜貫通脂質CおよびDの化学構造を示す。これらの脂質はバイオセンサー膜の内層を構成するのに適した脂質の好ましい例である。

図7は、ビオチン化されたグラミシジンEの表示を与える。

図8は、種々のジゴキシゲニン誘導体の化学構造を示す。

図9は、MALDI（マトリックス支援レーザー脱着イオン化）質量分析を使ったBSA-ジゴキシゲニン共役体から得られた分光図である。

図10は、マイクロタイタープレート上に固定したBSA-ジゴキシゲニン共役体の免疫適格性を示すELISA分析結果を示す。

先願特許および先願特許出願においては、イオンチャンネル含有膜に基づくバイオセンサーにおいてアナライトの濃度に左右されて電気信号を作る機構が開示された。上記のように、本発明はそのような信号を、特にアナライトが小さい分子（すなわち、5000ダルトン未満の分子量）の場合に作る追加の方法から成る。

機構

1. 直接通門(direct gating)(図1a)

微量分析の対象物質、もしくはその誘導体または類似体から成る受容体は、移動可能な外側イオンチャンネルに結びつけられる。微量分析の対象物質を認識して結合する事が可能な抗体、その断片またはその他の分子種を、チャンネルのイオン伝導率の変動を誘発する受容体に結合する。上記の集成材に分析の対象物質を含む媒体を作用させると、分析対象物質は、抗体の抗原結合部位またはその他

の分析対象物質を認識する種と競合する。かくして試験すべき媒体中の分析対象物質の濃度に関連する、抗体またはその他の分析対象物質を認識する種の一部は、イオンチャネルの結合した受容体から除かれて、当初の伝導状態に復帰する。

2. 外側チャネル集合体(図1b)

上記第1部に記述した様に、イオンチャネルを担持する受容体で膜を調製する。微量分析の対象物質の1個を超えるコピーを認識して結合可能な抗体、その断片またはその他の分子種を、次いで受容体に結合する。抗体またはその類似種が抗原に結合する部位間の距離は、不動化した内層イオンチャネル間の(80%を超えない)距離でなくてはならない。抗体またはその類似種の結合は、外側半膜貫通イオンチャネルの凝集を生じ、内側半膜貫通イオンチャネルとの配列から外れて、膜の伝導性の低下をもたらす。上記の集成材に分析の対象物質を含有する媒体を接触させると、抗体またはその他の分析対象物質を認識する種の抗原結合部位に、分析対象物質が競合する。この様にして、試験すべき媒体中の分析対象物質の濃度に関連する、抗体またはその他の分析対象物質を認識する部分が、イオンチャネル結合受容体から離脱されて、当初の伝導状態に復帰する。

3. 外側および内側チャネル側方分離-遊離抗体(図1c)

上記第1部に記述した様に、イオンチャネルと受容体を担持する膜貫通脂質より膜を調製する。典型的には、膜内で受容体を担持する膜貫通脂質の濃度は、外側イオンチャネルの濃度より遙かに高い。更に、膜貫通脂質の濃度および内側イオンチャネルの濃度は、膜貫通脂質と内側イオンチャネルの隣接がまれな出来事であるように選ばれる。微量分析の対象物質の1個を超えるコピーを認識して結合可能な抗体、その断片またはその他の分子種を、次いで受容体と結合する。抗体またはその類似種の結合は、外側イオンチャネルの不動化した膜貫通脂質との交差結合を引き起こし、内側半膜貫通イオンチャネルとの整列から外れて、膜の伝導率を低下させる。上記の集成材に分析対象物質を含有する媒体を接触させると、分析対象物質は抗体またはその他の分析対象物質を認識する種の抗原結合部位に競合する。この様にして試験すべき媒体中の分析対象物質の濃度に関連

する抗体またはその他の分析対象物質を認識する種が、イオンチャンネルの結合する受容体から除かれて、当初の伝導状態に復帰する。

4. 外側および内側チャンネルの側方分離-イオンチャンネルまたは膜貫通脂質上に結合された抗体(図1d)

外側イオンチャンネルと膜貫通脂質から膜を調製し、そこでは、外側イオンチャンネルまたは膜貫通脂質が上記第1部に記述した様に、受容体を担持する。微量分析の対象物質を認識して結合可能な抗体、その断片またはその他の分子種は、受容体を担持しない外側膜層の成分(イオンチャンネルまたは膜貫通脂質)に結合させる。これによって外側イオンチャンネルを、不動化した膜貫通脂質に交差結合させ、内側半膜貫通イオンチャンネルとの整列から外れて、膜の伝導率を低下させる。上記の集成材に分析対象物質を含有する媒体を接触させると、分析の対象物質は抗体の抗原が結合する部位、またはその他の分析対象物質を認識する種と競合する。かくして、外側イオンチャンネルの一部が固定された膜貫通脂質から切り離されて、内側半膜貫通イオンチャンネルと共に膜貫通イオンチャンネルを形成し、膜の伝導率を増加させる。

5. 外側および内側チャンネルの側方分離-イオンチャンネルまたは及び膜貫通脂質上に結合された抗体(図1e)

外側イオンチャンネルと膜貫通脂質から膜を調製し、そこでは、微量分析の対象物質を認識して結合可能な抗体、その断片またはその他の分子種が、外側イオンチャンネルおよび膜貫通脂質と結合される。膜は次いで微量分析対象物質、その誘導体またはその類似物の1個を超えるコピーを担持する分子種(例えば、蛋白質、高分子または微少有機分子の様な)を用いて処理される。これによって外側イオンチャンネルが不動化した膜貫通脂質と交差結合して、内側半膜貫通イオンチャンネルとの整列から外れて、膜の伝導率を低下させる。上記の集成材に分析対象物質を含有する媒体を接触させると、分析対象物質は抗体の抗原結合部位、またはその他の分析対象物質を認識する種と競合する。かくして、外側イオンチャンネルの一部が固定された膜貫通脂質から切り離されて、内側半膜貫通イオン

チャンネルと共に膜貫通イオンチャンネルを形成し、膜の伝導率を増加させる。

本通門(gating)機構の好ましい実施態様として、外側半膜貫通イオンチャンネルは、グラミシジンのビオチン化誘導体であり、微少な分析対象物質を認識して結合可能な分子種は、ビオチン化Fab分画であり、ストレプタビジン(streptavidin)、アビジン(avidin)またはそれらの変形類似体を介して外側イオンチャンネルおよびビオチン化膜貫通脂質に結合される。微少分析対象物質、その誘導体またはその類似物の1個を超えるコピーを担持する好ましい分子種(例えば、蛋白質、高分子または微少有機分子)は、ウシ血清アルブミン(BSA)リジン側鎖アミンにアミド結合を介して結合する分析対象物質類似体の機能を有する蛋白質BSAである。

受容体の膜成分への結合方法

上記の実施例に於いて、微少分析対象物質様または抗体様の受容体は、外側イオンチャンネルおよび/または膜貫通脂質に結合せねばならない。受容体の結合形式には、当業者に周知のすべての方法が含まれるが、特に以下が挙げられる：

- ・受容体の単一コピーの膜成分(イオンチャンネルまたは膜貫通脂質)への共有結合。
- ・受容体の複数コピーと、蛋白質(例えばBSA)の様な中間種に対する受容体のコピーの共有結合を含む膜成分、または自身で膜成分と結合する高分子との共有結合(図2d)。
- ・受容体の単一(図2a)または複数(図2c)コピーの、非共有結合を介する膜成分との結合、例えばストレプタビジンまたはアビジン分子を介して結合する膜成分および受容体へのビオチン群の供給。当業者に容易に評価される様に、十分な耐性を有する対のすべての非共有結合が、この役目をストレプタビジンおよびビオチンに代わって用いられる。例えばジニトロフェニル(DNP)ハプテンおよび抗DNP抗体が挙げられる。
- ・受容体のストレプタビジンの様な種への共有結合に続く、膜成分への非共有結合(図2b)。

微少分析対象物質様の受容体の複数コピーが、単一の外側イオンチャンネルに結合する場合には、2個以上の結合部位を有する抗体様種の付加にイオンチャン

ネ

ルの重合による関門が存する可能性がある事に注意せねばならない(図3)。これによって外側チャンネルの凝集による関門の拡張型がもたらされる(図1b)。

実施例

膜の構成方法

多重結合ハプテン種から成る微量分析対象物質を感知する為に用いられる支持体上の二重層は、”感知膜の自己集成材”の名称を有する出願日1996年6月20日の同時係属国際特許出願(PCT)に記述された方法で構成される。

即ち、清浄な金表面で被覆された電極をリンカー脂質A(図4)、メルカプト酢酸のジスルフィド(disulfide of mercaptoacetic acid: maad)、リンカーグラミシジンB(図5)、膜貫通脂質C(図6)および膜貫通脂質Dを含有する溶液に接触させると、溶液内のジスルフィドを含有する成分が、電極の金表面に吸着される。典型的にはこの溶液は以下の濃度でジスルフィドを含有する。

リンカー脂質A	1 mM
maad	1 mM
リンカーグラミシジンB	0.0001 mM
膜貫通脂質C	0.0010 mM
膜貫通脂質D	0.0001 mM

エタノールに溶解させる

電極は次いで洗浄し、洗浄に用いた過剰な有機溶媒は除く。脂質二重層の第2層は、次いで脂質およびビオチン化グラミシジンEを含有する溶液を添加し(図7)、適当な溶媒中で、第1層を含有する電極表面土に拡散させ、水溶液で電極表面を洗浄する。典型的には、第2層を構成する溶液は以下のものを含むことができる：

ジフィタニルフォスファチジルコリン	7 mM
グリセリルジフィタニルエーテル	3 mM
ビオチン化グラミシジンE	0.0002 mM

エタノールに溶解させる

この様にして形成された二重層膜に、ストレプタビジン、アビジン、ニュウトラビジン(neutravidin)またはその他のアビジンもしくはストレプタビジン誘導体を添加する(典型的には $50\mu\text{g/ml}$ 濃度の10分間の反応)。電極は次いで過剰なストレプタビジン、アビジン、ニュウトラビジンもしくはその他のアビジンまたはストレプタビジン誘導体を除く為に水溶液で洗浄する。次いで、ビオチン化受容体分子の溶液(例えば、ビオチン化抗ハプテン抗体分画)を添加する。この膜は次いで洗浄し、複数ハプテンを有する種を含有する溶液を(典型的には濃度 $10\sim 100\text{ nM}$ を $10\sim 15$ 分間)添加する。この膜は次いで最終洗浄する。

”複数ハプテン重”(即ち、複数分析対象物質を付着させる担体)の必要性

最小分子の場合、複数ハプテン種は短い炭素(またはその他の、言うなれ $4\sim 50$ 個原子の)担体鎖によって結びつけられたハプテン二量体であることが出来る。代わりに、(例えば、ウシ血清アルブミンまたはポリリシンの様な)蛋白質、(例えばデキストランまたはカルボキシメチルデキストランの様な)多糖類または(例えばポリアクリル酸の様な)合成高分子または共重合体の担体が使用可能である。蛋白質または高分子の使用は、水性媒体中では低い溶解性のハプテンに追加の溶解性をもたらす利点となることが予見される。分子量 $10,000\sim 100,000$ ダルトン範囲の蛋白質または高分子が最適と予想される。

多ハプテンウシ血清アルブミン共役物の調製

ジゴキシゲニンNHSエステル(3)の調製

(図8に示すジゴキシゲニン誘導体)

ジゴキシゲニン-3-ヘミスクシネート(digoxigenin-3-hemisuccinate)は米国特許第3,855,208号に詳細が記された方法で製造された。このヘミスクシネート(70 mg 、 0.1426 mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(98 mg 、6当量)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(118 mg 、4当量)およびN,N-ジメチル-4-アミノピリジン(DMAP)(18 mg 、1当量)を、テトラヒドロフラン(THF)(10 ml)中に溶解させて、窒素気流中、一夜室温でかき混ぜる。

反応混合物は沈殿したジシクロヘキシルウレア(DCU)を除く為に濾過する。濾

液は蒸発濃縮し、N-(6-アミノカプロイル)-6-アミノカプロン酸ベンジルエステ

ル(XXBn)(95 mg、2当量)の 25% MeOH/DCM(5 ml)溶液をpH 8で加える。反応混合物は室温で一夜かき混ぜる。

反応混合物は蒸発濃縮し、2 × 10 cmのカラムを用いたシリカゲルクロマトグラフィー(溶離渣、5% MeOH/DCM)で精製した。生成物を含有する溶出液No. 26~45(各5 ml分画)は蒸発乾固した。残留物を水洗、乾燥して、生成物(1)(68 mg)を得た。

生成物(1)(58 mg)のMeOH (5 ml) 溶液を、触媒量のバラジウム活性炭と共に水素気流中で1時間かき混ぜた。反応混合物は次いで濾過、濃縮して遊離酸(2)(50 mg)を得た。

生成物(2)(50 mg)、0.069 mmol)、DCC(43 mg、 3当量)およびNHS(9 mg、5当量)の乾燥蒸留THF(10 ml)溶液を、窒素気流中、室温で一夜かき混ぜた。反応混合物を濾過してDCUを除き、蒸発してジゴキシゲニンNHSエステル(3)を得た。本物質は更に精製することなく使用した。

ジゴキシゲニン共役物の合成

ジゴキシゲニンNHSエステル(3)のエタノール(20 mM、4 ml、0.08 mmol)溶液を、0.05M磷酸ナトリウム (10 ml、pH 8.0) および10mlジメチルフォルムアミド (DMF) 混液に溶解したウシ血清アルブミン(BSA)(250 mg、0.0037 mmol)溶液にかき混ぜながら加えた。反応3日後に、反応混合物を0.05M磷酸ナトリウム緩衝液に対して24時間透析した。蛋白質濃度は280 nmの吸光度で測定し、共役物は4℃で保存する。各BSA分子に結合したハプテンの平均数は、BSA当たりジゴキシゲニン6分子としてMALDI(Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)マスペクトルで測定した(図9)。ジゴキシゲニンBSA共役物の免疫能力は、微量滴定板上に固定したBSA-ジゴキシゲニン共役物を用いて、ELISA試験で示した(図10)。

分析対象物質の検出

分析対象物質の検出は、含有する試料を上記の様に調製した集成材膜に添加することで得られる。試料中の分析対象物質は、膜種に付着した受容体の担体上の

分析対象物質およびその類似物と競合して、イオンチャネルと膜貫通脂質との橋を切断する。その結果は試料中の分析対象物質の濃度に関連して膜伝導率の上

昇として現れる。

当業者には、広範囲に記述された本発明の精神および範囲から逸脱することなく、特定の実施態様で示された本発明の多数の変形および／または変型が行い得ると評価する事が出来る。従って、本実施態様はすべての点に於いて例示的であり、限定的ではないと判断すべきである。

【図1】

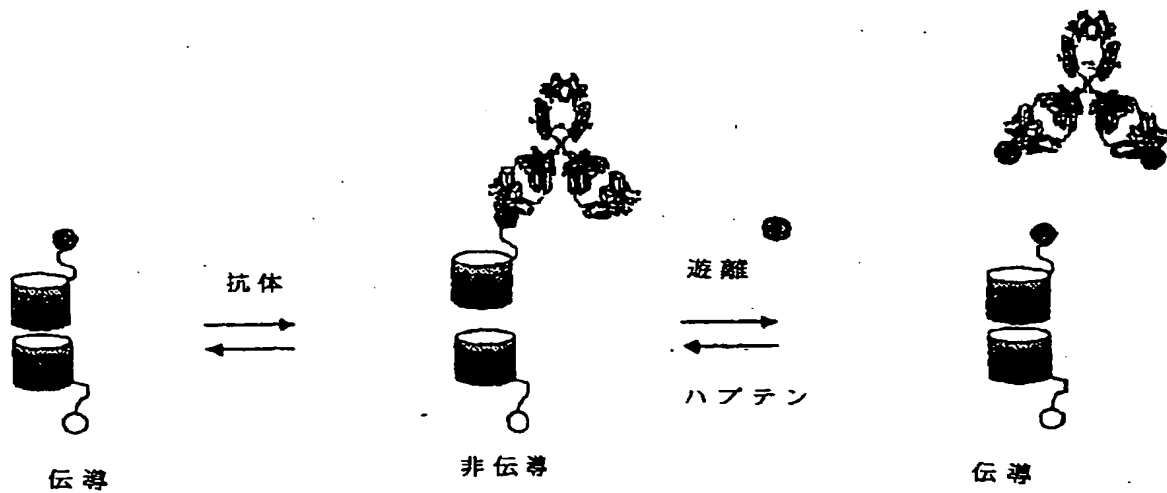


図1a

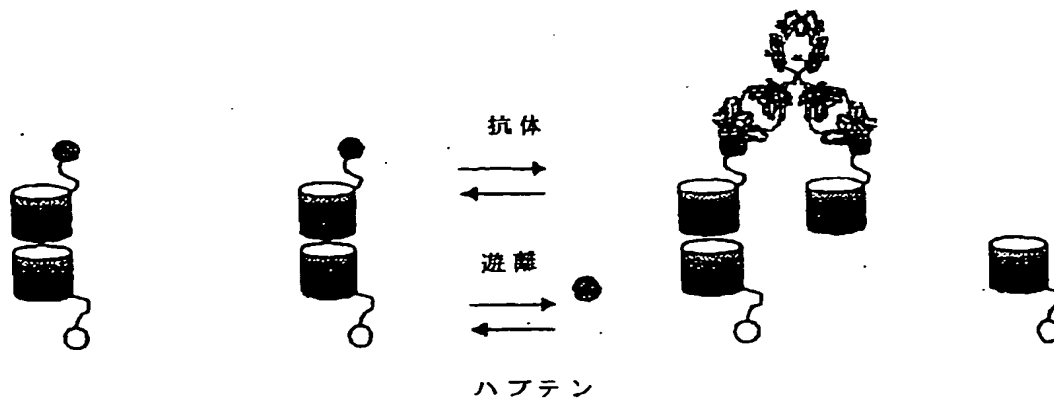


図1b

【図1】

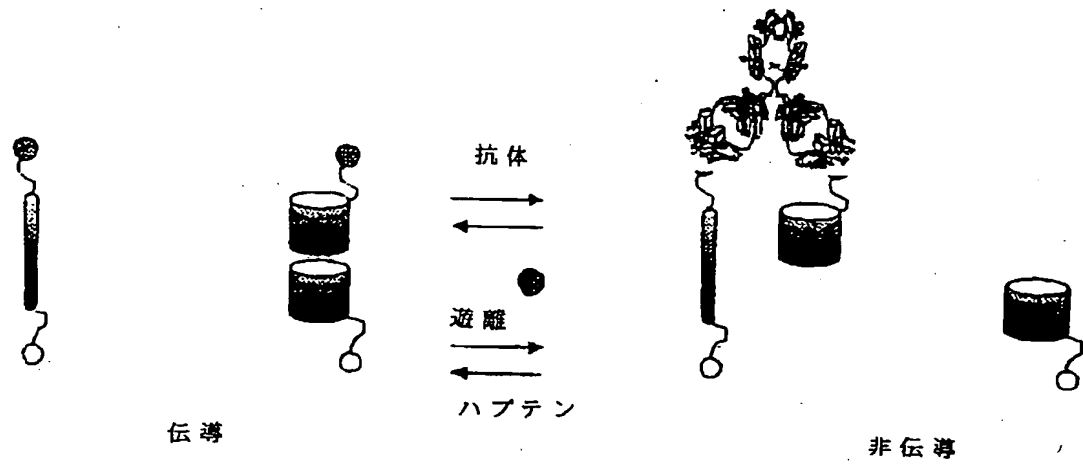


図1c

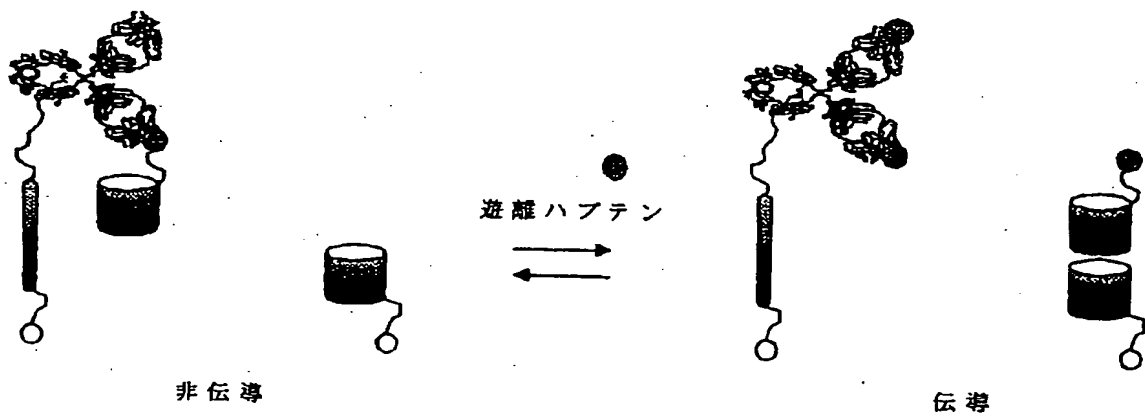


図1d

【図1】

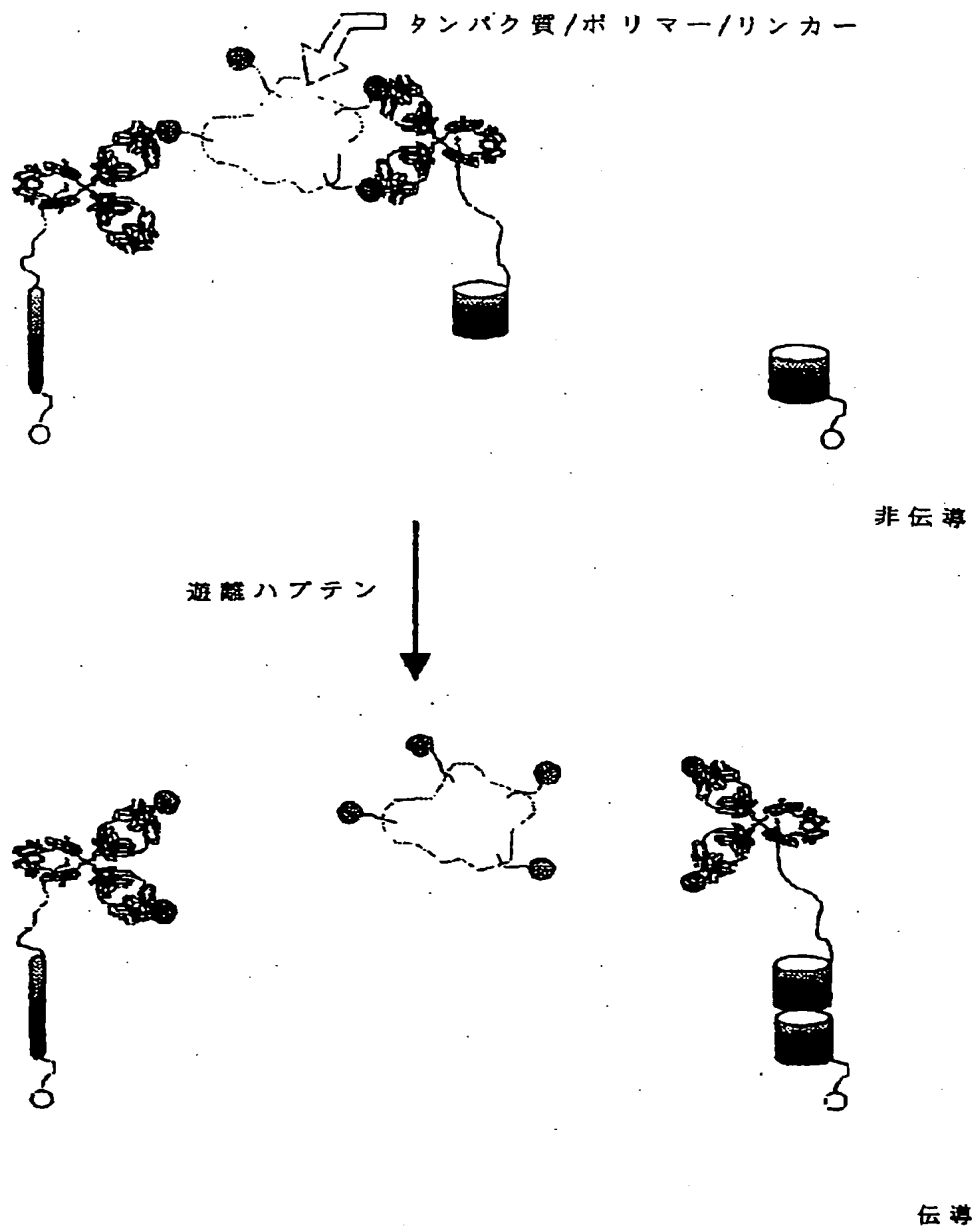


図1e

【図1】

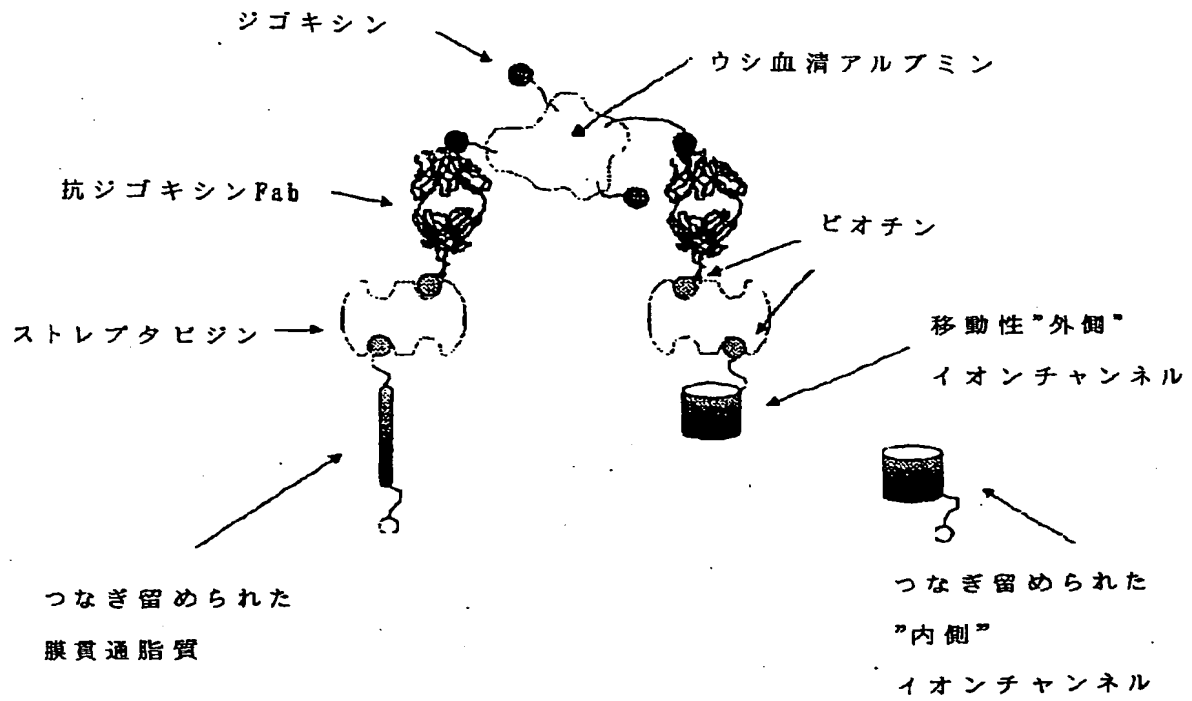


図1f

【図2】

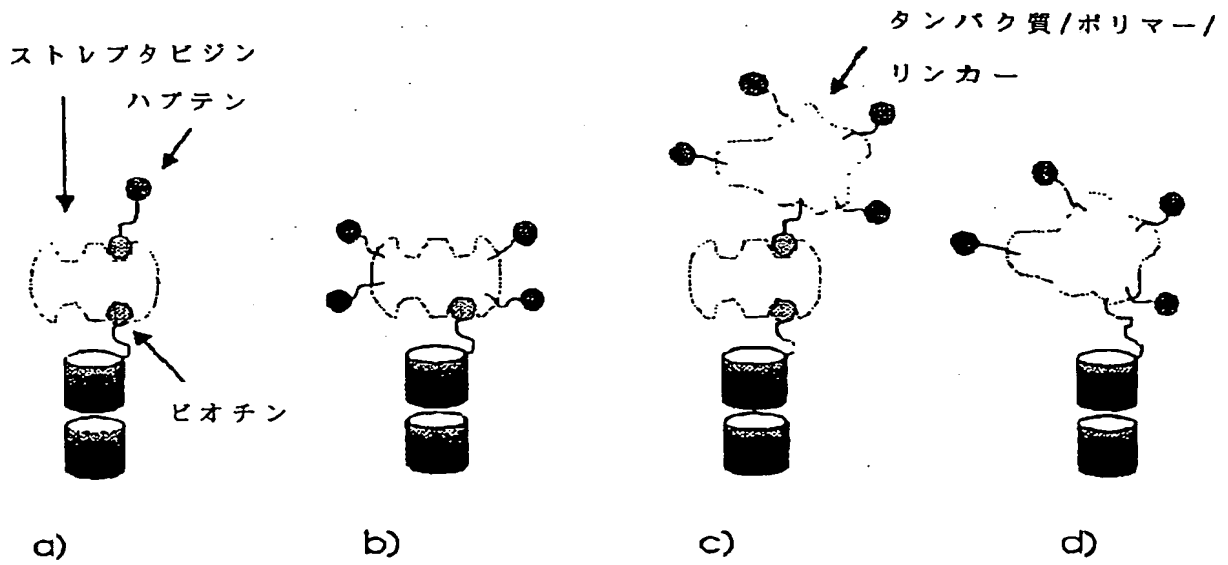


図2

【图3】

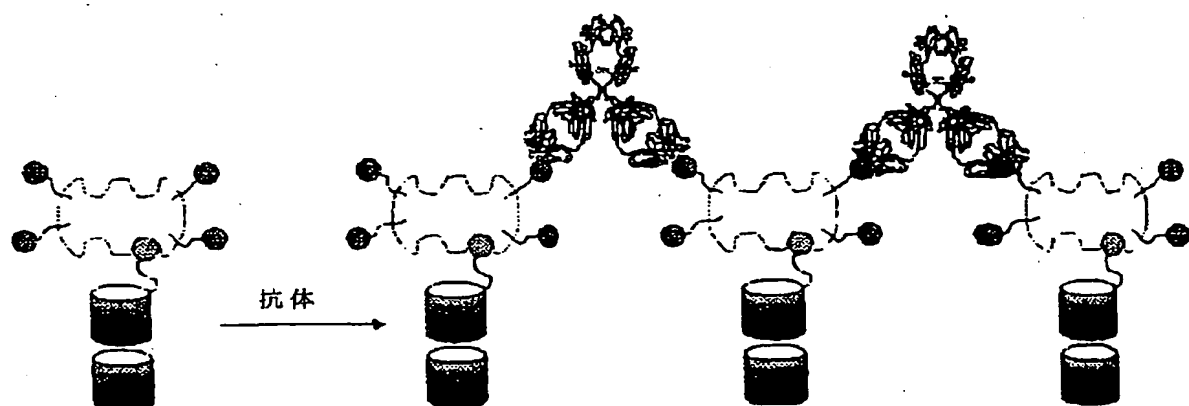


图 3

【図4】



図4 リンカー脂質A

【図 5】

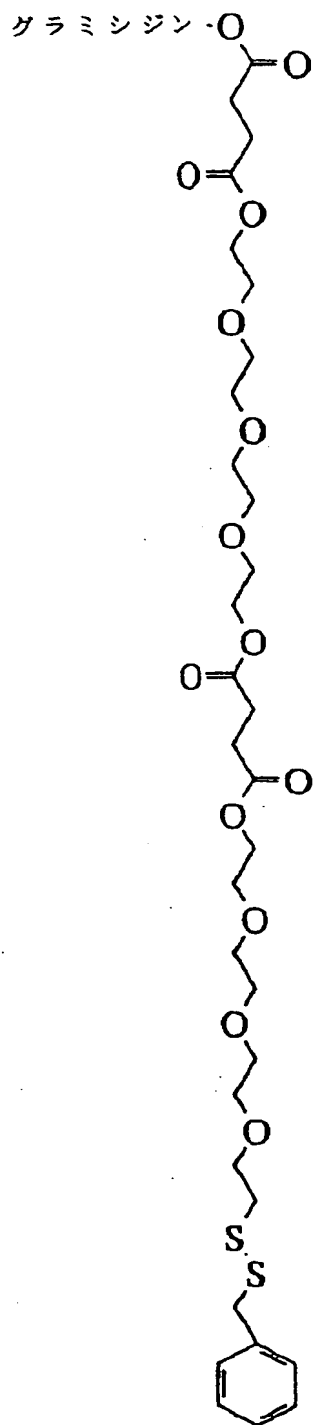
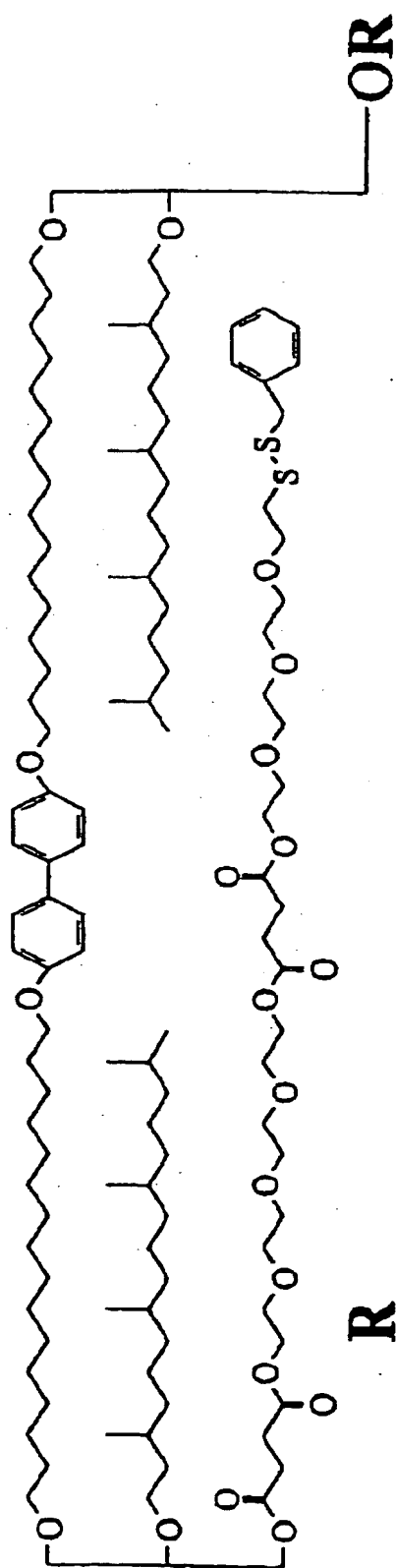


図5 リンカーグラミシジンE

(24)

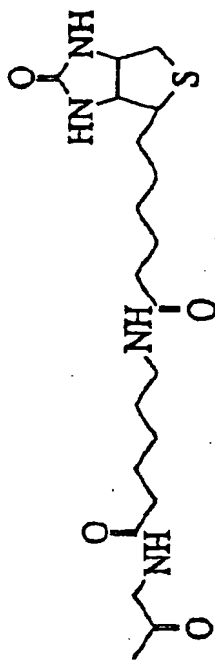
【図6】



\bar{R}



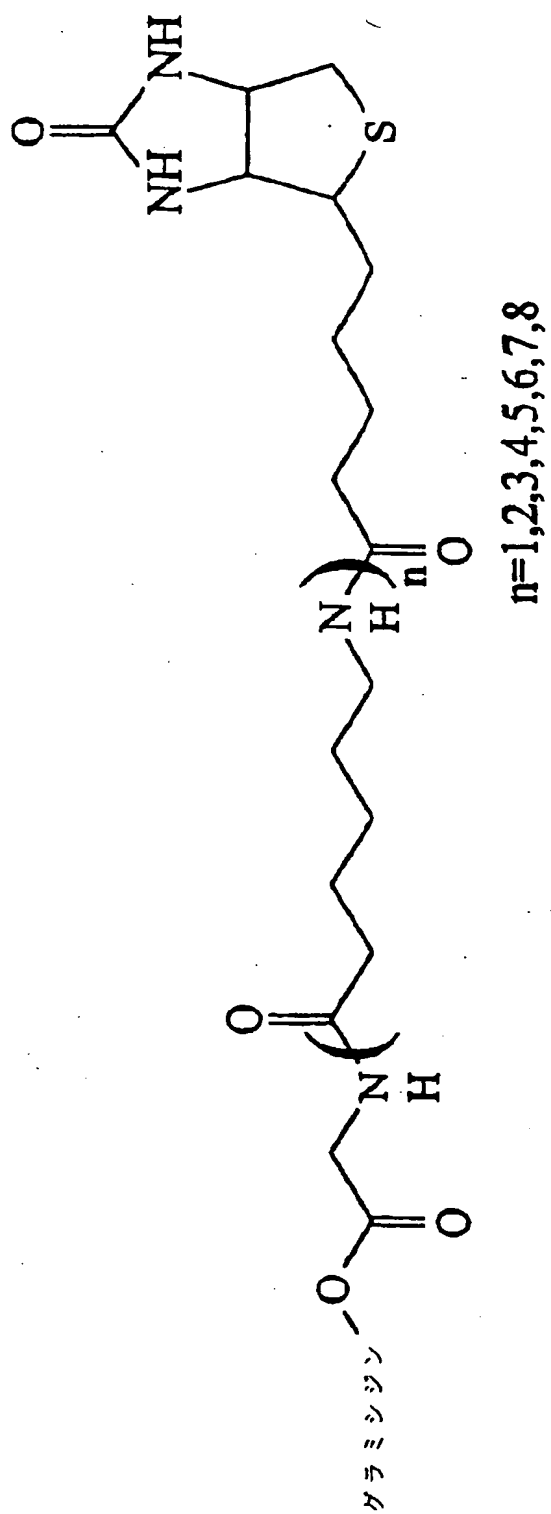
膜貫通脂質D



膜貫通脂質C

図6

【図7】

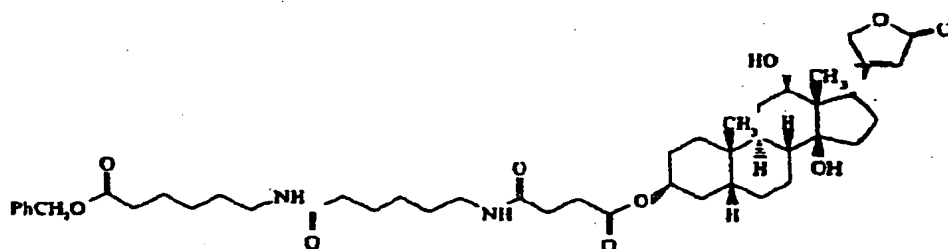


ビオチン化されたグラミシジンE

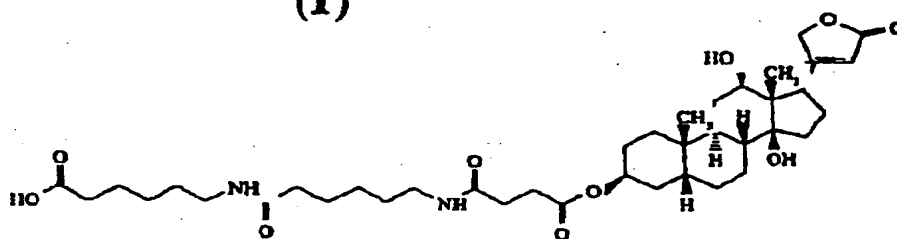
図7

【図8】

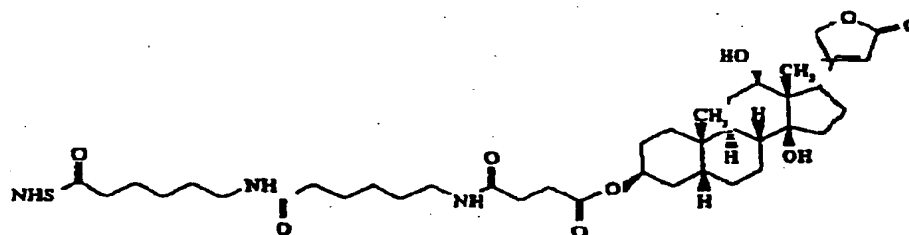
ジゴキシゲニン誘導体



(1)



(2)



(3)

【図9】

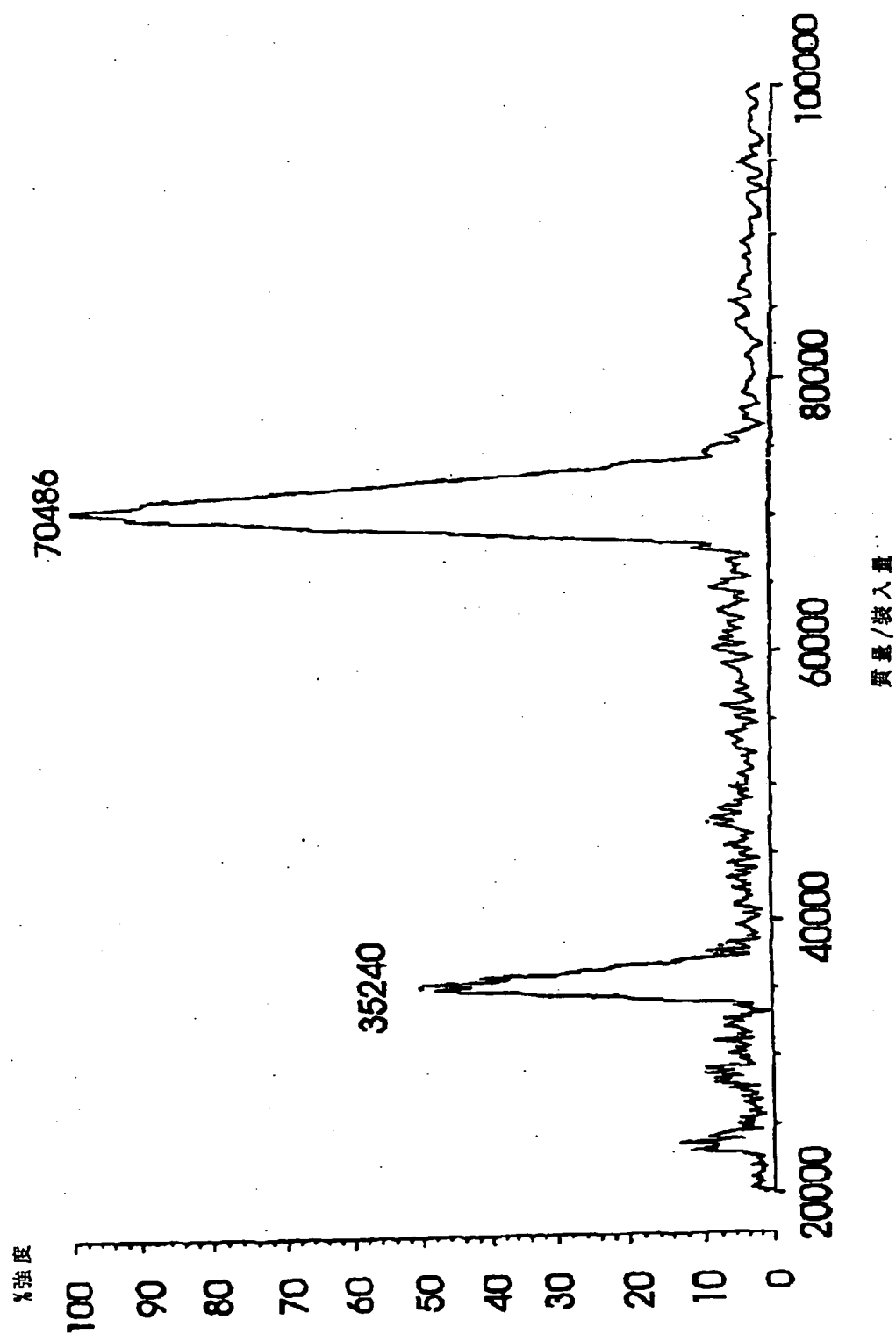


図9 BSA-ジゴキシゲニン複合体のMALDI質量スペクトル

【図10】

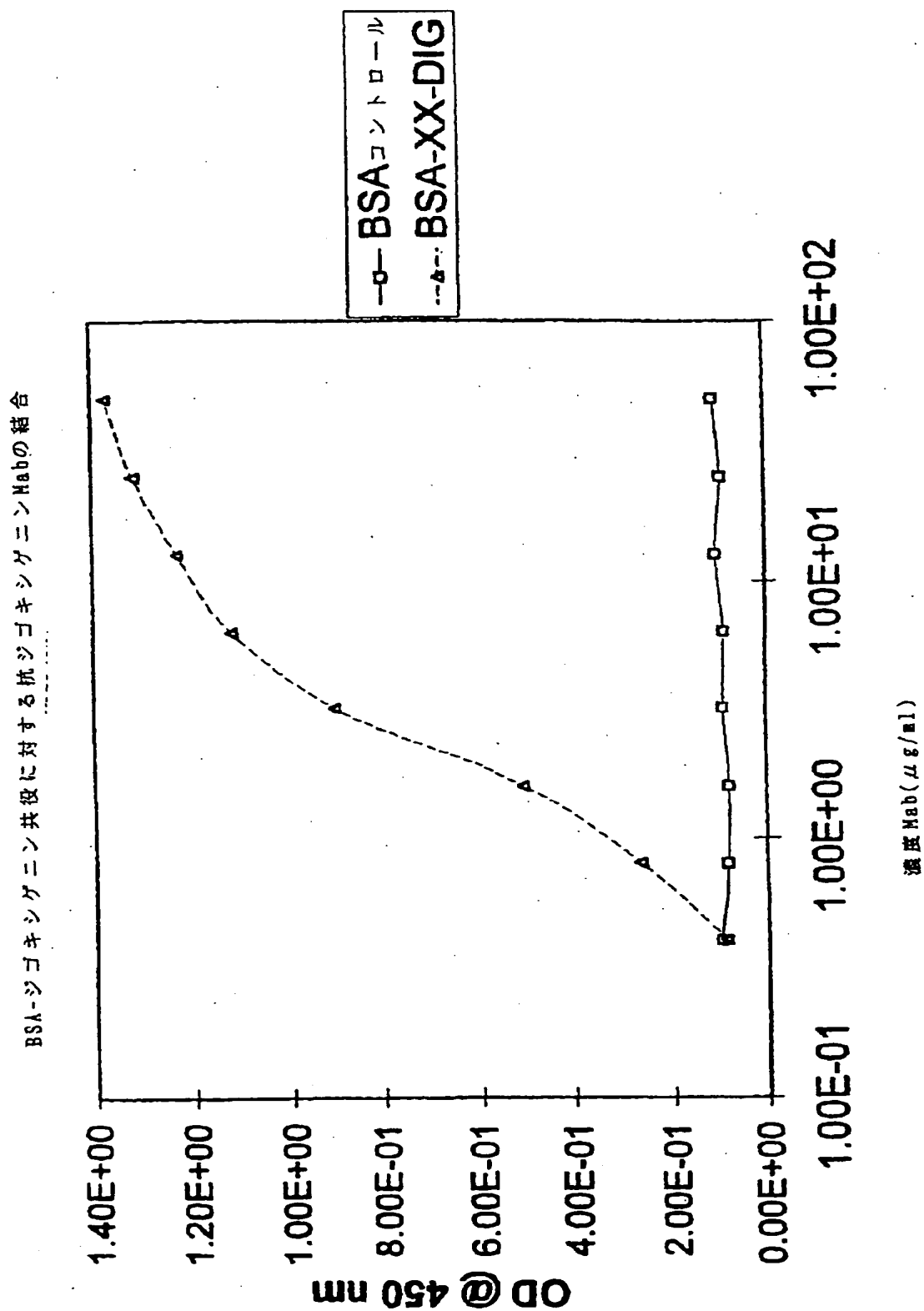
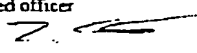


図10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/AU 96/00368

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int Cl ⁶ : G01N 27/333 27/327 27/403		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC G01N 27/333 27/327 27/403 27/40 27/30 33/544 33/545 33/54		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DERWENT: membrane: ionophores: lipid: amphiphilic: linker or bridge: IAPIO: membrane: ionophores: lipid: amphiphilic: linker or bridge:		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 92/17788 A (AUSTRALIAN MEMBRANE AND BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE) 15 October 1992 abstract	1, 12, 23
A	WO 93/21528 A (EUROPEAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 28 October 1993 abstract	1, 12, 23
A	WO 94/07593 A (AUSTRALIAN MEMBRANE AND BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE) 14 April 1994 abstract	1, 12, 23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"U" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 7 August 1996		Date of mailing of the international search report 19 AUG 1996
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN INDUSTRIAL PROPERTY ORGANISATION PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Facsimile No.: (06) 285 3929		Authorized officer  Z. STANOJEVIC Telephone No.: (06) 283 2168

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/AU 96/00368

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5204239 A (GITLER et al.) 20 April 1993 abstract	1, 12, 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT**Information on patent family members**

International Application No.

PCT/AU 96/00368

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
WO	92/17788	AU	14657/92	AU	666113	CA	2106966
		EP	639269	US	5401378		
WO	93/21528	EP	637384				
WO	94/07593	EP	670751				
US	5204239	AU	69245/91	AU	625017	CA	2033776
		EP	441120	IL	93020	JP	6090736

フロントページの続き

(72)発明者 キング, ライオネル ジョージ
オーストラリア国 2113 ニューサウスウ
ェールズ ノース ライド ベアトリス
ストリート 27